

実験的佝僂病に関する研究*

第1報 骨におけるアルカリ性 Phosphatase について

松 蘭 正 利

札幌医科大学小児科学教室 (主任 南浦教授)

Experimental Studies on Rickets

I. On the Alkaline Phosphatase in Bone

By

MASATOSHI MATSUZONO

Department of Pediatrics, Sapporo University of Medicine
(Chief: Prof. K. MINAMIURA)

燐酸エステルは生物体内に広範に存在し、酵素化学の進歩とともに、近來ますますその重要性が明かになつてきたが、この燐酸エステルの合成、分解の過程に関与するといわれる phosphatase (以下 ph と略称する) は、生体内における種々の代謝において、重要な役割を持つものと考えられている。また化骨機転におけるこの ph 特にアルカリ性 phosphatase (以下 al-ph と略称する) の重要性に関しては、Robison¹⁾ (1923) がいわゆる“bone enzyme”の存在を認めて、化骨機転におけるこの酵素の重要性を指摘して以来、多くの研究がなされてきた。

さらに高松²⁾ (1938) 及び Gomori³⁾ (1939) によりこの酵素の組織化学的検索の方法が樹立されて、従来の生化学的領域のみならず、あわせて各組織像によつても、その分布状態の観察も可能になつた。実際に骨及び歯の生長の進行している部位、或いは骨折の際骨塩の沈着を来す場所として、組織化されつつある仮骨の部位には、al-ph が豊富に存在することは生化学的⁴⁾ に、また組織化学的⁵⁾ に

も証明されている。家鶏胎児或いは家兎の骨培養において、それ等が石灰化され始める進化の時期の直前直後は、非常に al-ph の活性度が増加するという⁶⁾。人体においても、膝蓋骨は生後2才までは化骨しないが、化骨の時期の到来によつてはじめて、al-ph の存在を認めるという⁷⁾。

これ等の事実は、al-ph の組織化学的分布と、石灰化の進行している部位との間に、殆ど完全な関連性の存在を意味し、骨塩の沈着作用における al-ph の役割を示唆している。

しかしながらこの化骨過程における al-ph の作用機転については、未だ完全な説明はなされていない。例えば V-D 欠乏症であり化骨障害を伴なう佝僂病では、骨 al-ph は却つて増加¹⁾ した血清 al-ph も極めて著明に増量⁸⁾ するが、V-D 投与により骨 al-ph⁹⁾ も血清 al-ph¹⁰⁾ もともに減少して、正常値に還ることが知られている。

この事実は、骨 al-ph が石灰化の機転に関与するという見地から考えて、一見その役割に矛盾した現象の如く思われる。

* 本研究費は北海道科学研究費補助金によつた。ここに深甚の謝意を表す。なお本論文の要旨は第56回日本小児科学会総会(昭和28年4月)及び第30回北海道医学会大会(昭和28年6月)において発表した。

1) Robison: Biochem. J. 17, 286 (1923).

2) 高松: 日病誌 29, 492, 兒玉・高松: 日病誌 29, 498(昭14).

3) Gomori: Proc. Soc. Exp. Biol. & Med. 42, 23 (1939).

4) Roche & Bullinger: Bull. Soc. Chim. Biol. 21, 166

(1939).

5) Lorch: Quart. J. Microscop. Sci. 88, 195 (1947).

6) Fell & Robison: Biochem. J. 23, 767 (1927); 28, 2243 (1934).

7) Sumner & Myrbäck: The Enzyme. 1 (1), 501(1050).

8) Kay: Brit. J. Exp. Path. 10, 253 (1929).

9) Baumgarten: Biochem. Z. 213, 170 (1929).

10) Kay: J. Biol. Chem. 89, 235 (1930).

佝僂病における骨 al-ph の組織化学的研究については、高松・児玉²⁾ (1939) を始めとし、多くの業績が報告されているが、佝僂病発現の過程を追った組織化学的研究は殆ど見られないようである。

今回私は佝僂病発現に最も密接な関係があると考えられる骨組織につき、発現過程を追って、組織化学的に、主として al-ph について検索し、しかして佝僂病の発現を招来する因子が、骨形成期間中、骨 al-ph の分布に如何なる影響を及ぼすかを観察せんとして以下の実験を試みた。

実験動物及び実験方法

1) 実験動物及び飼料：実験動物は家兎で、なるべく実験条件を等しくするため、実験に使用する母兎は、各実験群共同一種類のもので体重 3 kg 程度のもを選び、交尾には同一雄兎を使用した。しかる後以下述べる如き飼料と環境下で、それぞれ妊娠、分娩、それぞれの母乳により飼育した仔兎を使用した。

実験群を次の群に分つ。

第1群：妊娠直後よりの実験群

< V-D₂ 授与群
 < V-D₂ 非授与群

第2群：分娩直後よりの実験群

< V-D₂ 授与群
 < V-D₂ 非授与群

第3群：正常対照群

第1群のために使用する母兎は、実験開始まで2箇月間、第2群の母兎は妊娠中1箇月を加えて3箇月間、それぞれ戸外で燕麦、クローバー、人蔘を主とした普通飼料を同一量宛与えて飼育した。

しかる後第1群においては交尾完了直後、第2群においては分娩直後、それぞれ母体に V-D₂ (チョコラ D) 10 万単位を筋肉内注射した群と、注射しないそれぞれの対照群とを分ち、何れも藤巻¹⁾ の佝僂病食餌 (別表) を与え暗室内で飼育した。

かくして、それ等の母体よりそれぞれ出生せる仔兎を実験に使用した。これ等仔兎は先ずそれぞれの母兎の母乳を以て飼育し生後 15 日前後から、母乳の他に母兎と同様佝僂病食餌を与えはじめ、生後 30 日で母体と離し、引きつづき佝僂病食餌、暗室内で生後 60 日まで飼育した。しかして第1, 2 群とも4匹以上の仔兎を娩出した母体から得た仔兎を、第1群の実験には V-D₂ 授与群で 28 匹、非授与群で

34 匹、第2群の実験には V-D₂ 授与群では 24 匹、非授与群では 28 匹の仔兎を使用した。

なお以上の各群の他に、第3群として妊娠直後より実験時まで引続き普通飼料、普通環境下で飼育して得た仔兎 18 匹を正常対照群とし、前述の各群と比較した。

〔別表〕：藤巻の佝僂病食餌

豆腐粕	85
小麦	10
炭酸石灰	3
食塩	2

なおこの配合食の他に、V-D 以外の Vitamin 補給の意味で毎日 100 g 宛の白キャベツを与えた。

2) 実験方法：前述の各群の仔兎につき生後 60 日まで、10 日目毎にこれを殺し、直に尺骨遠端軟骨部を、隣接せる骨組織とともに、予め 4°C に保つた Chloroform-Alkohol 中に固定する。al-ph の検索には Lorch-Gomori¹²⁾ の変法を用いた。この方法を要約して述べると、

- 1) 固定：4°C で Chloroform-Alkohol 中 18 時間
- 2) 水洗：蒸溜水中で 2 ~ 3 分間
- 3) 脱灰：脱灰液は次の如く調製する

A 液		B 液
Citrinsäure Kryst.	21.0 g	n/10 HCl
n-NaOH	200.0 cc	
Aq. dest	1,000.0 cc	

A 液の 70 cc と B 液の 30 cc を混じ、それに 1% 硫酸鉛 0.2 cc と Chloroform 1 滴を加う。この脱灰液は 10°C に保ち 1 日 2 回とりかえる。脱灰には 8 日間を要する。

- 4) 水洗：蒸溜水中で 2 時間
- 5) 再活性：37°C の 0.075 % Glykokol を含んだ 1 % の Veronal 液で
- 6) 水洗：蒸溜水で数分間
- 7) 脱水：Alkohol 列において速やかに脱水
- 8) Paraffin 包埋：56°C で 1 時間半
- 9) Schnitten の作製：包埋後 24 時間以内、厚さは 10 μ
- 10) Schnitten の乾燥 → Xylol → Alkohol abs. → Kolloidum 95 % Alkohol → 50 % Alkohol → Wasser
- 11) Inkubation：次の液内で 37°C 6 時間

2 % Calcium nitrat	10.0 cc
2 % Magnesium chlorid	10.0 cc
4 % Natrium-glycerinphosphate	10.0 cc
1 % Veronal	70.0 cc

- 12) 2 % Calcium nitrat 2 分間
- 13) 2 % Kobalt nitrat 5 分間 → 入念な水洗 → 2 % Ammonium sulfid 2 分間

11) 泉：大日本小児科全書, XI, IV, 186 (昭 12).

12) Majno & Rouiller: Virchow's Arch. 321, 10 (1951).

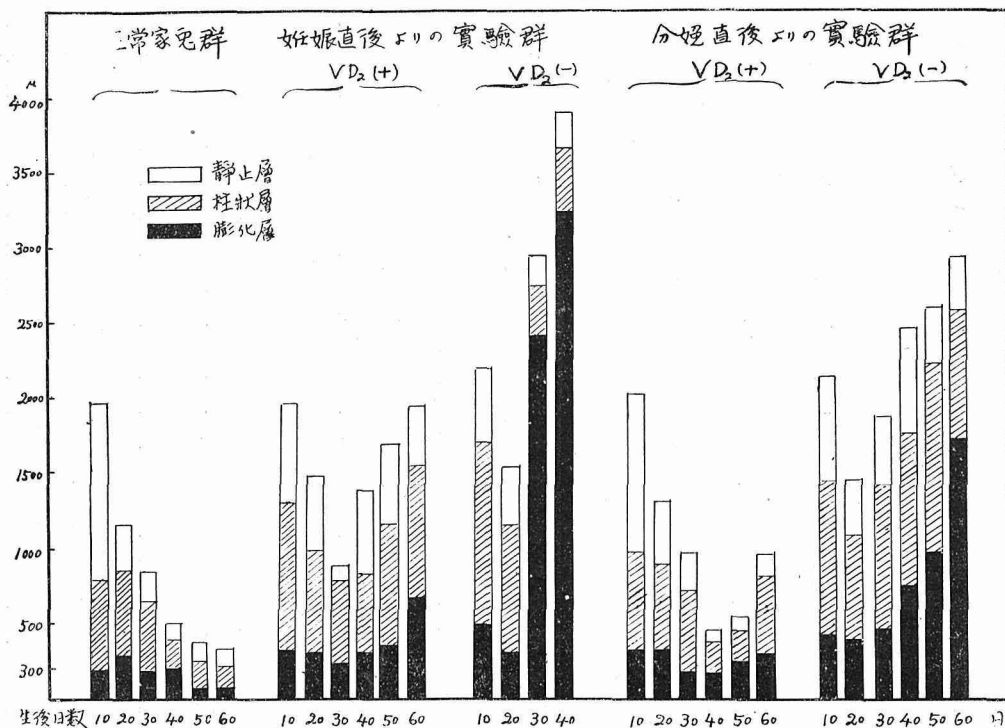
尺骨遠端軟骨の幅は、以上の方法で得た標本につき、オクラーミクロメーターによつて測定した。

実験成績

1. 各群における尺骨遠端軟骨の幅(第1図): 骨端軟骨幅を測定するに当り、便宜上静止層、柱状層(細胞増殖層を含む—以下同じ)、膨化層(泡沫層、予備石灰層を含む—以下同じ)の三層に大別して測定した。第1図に示す如く、

a) 正常家兎群については、全体の幅は生後10日目で約2,000 μ であるが、生後日数の進むにつれて次第にその幅は縮少して行き、生後60日では約300 μ まで縮少している。しかしてその縮少して行く程度の最も烈しいのは、生後10日から20日までの間である。膨化層の幅も大体全体の幅の縮少と同様な傾向を示している。

b) 妊娠直後からの実験群においては、家兎母体へのV-D₂投与群では、全体の幅は生後10日で約2,000 μ で生後



第1図 各群の骨端軟骨の幅(尺骨)

30日までは縮少して約900 μ となる。

しかし生後40日になると却つて1,400 μ に拡大し、生後日数の進むにつれて漸次拡大し、生後60日にはまた2,000 μ に達する。膨化層の幅も大体それに平行して先ず縮少、次に拡大する。

V-D₂ 非投与群では全体の幅は、生後10日で約2,300 μ で最も広く、生後20日までは縮少して約1,570 μ となるが、生後30日になると、逆に3,000 μ と拡大し、生後40日で約4,000 μ まで拡大する。膨化層の幅も大体同様の傾向を示すが、生後30日以後からの膨化層の幅の拡大は他の各群に比し非常に著明である。

c) 分娩直後からの実験群においては、家兎母体へのV-D₂投与群では全体の幅は、生後10日で約2,100 μ で、生後日数の進むにつれて生後40日までは次第に縮少して

500 μ となる。しかし生後50日には約580 μ と拡大して生後60日で約1,000 μ となる。この群の幅の増減の変化は、正常群を除く各群に比し最もゆるやかである。

V-D₂ 非投与群では全体の幅は、生後10日で約2,230 μ で生後20日では縮少して約1,500 μ となる。生後30日になると逆に拡大し約1,930 μ となり次第に拡大して行き、生後60日では約3,000 μ となる。膨化層の増減の傾向も、V-D₂投与群、非投与群ともに大体の幅のそれに平行している。

2. 尺骨遠端軟骨における al-ph の分布(第1表):

a) 正常家兎群においては、大体生後日数を問わず、al-ph 反応の現われる部分は一定している。即ち静止層には殆ど al-ph 反応はみられず陰性である。柱状層においては、核のみやや淡染し、これは膨化層に近く細胞の大きく

第 1 表 各群における骨端軟骨のアルカリ性フォスファターゼ分布 (尺骨)

	生後 日数	静 止 層			柱 状 層			膨 化 層			泡 沫 層		
		核	原形質	細胞間質	核	原形質	細胞間質	核	原形質	細胞間質	核	原形質	細胞間質
正 常 家 兎 群	10日	—	—	—	±	—	—	+	±	—	+	±	+
	20	—	—	—	±	—	—	+	±	±	+	±	+
	30	—	—	—	±	—	—	+	±	±	+	±	+
	40	—	—	—	±	—	—	+	±	±	+	±	+
	50	—	—	—	±	—	—	+	±	±	+	±	+
	60	—	—	—	±	—	—	+	±	±	+	±	+
妊 娠 直 後 よりの 実 験 群	VD ₂ (+)	10	—	—	±	—	—	+	±	±	+	±	+
		20	—	—	±	—	—	+	±	±	+	±	+
		30	—	—	±	—	—	+	±	±	+	±	+
		40	—	—	±	—	—	+	±	±	+	±	+
		50	±	—	+	—	—	+	±	+	+	+	+
		60	+	—	+	—	—	+	±	+	+	+	+
	VD ₂ (-)	10	—	—	±	—	—	+	±	+	+	±	+
		20	—	—	+	—	—	+	±	+	+	±	+
		30	+	—	+	—	±	+	+	+	+	+	+
		40	+	—	+	—	±	+	+	+	+	+	+
分 娩 直 後 よりの 実 験 群	VD ₂ (+)	10	—	—	±	—	—	+	±	—	+	±	—
		20	—	—	±	—	—	+	±	±	+	±	—
		30	—	—	±	—	—	+	±	±	+	±	+
		40	—	—	±	—	—	+	±	±	+	±	+
		50	±	—	±	—	—	+	±	±	+	±	+
		60	±	—	+	—	—	+	±	±	+	+	+
	VD ₂ (-)	10	±	—	±	—	—	+	±	±	+	±	+
		20	—	—	±	—	—	+	±	±	+	±	+
		30	—	—	±	—	—	+	±	±	+	±	+
		40	±	—	+	—	—	+	+	+	+	±	+
		50	+	—	+	—	±	+	+	+	+	+	+
		60	+	—	+	—	±	+	+	+	+	+	+

なるにつれて, al-ph 反応陽性度が明瞭になる。原形質, 細胞間質は殆ど al-ph 反応を示さない, 膨化層では, 核が濃染しているが, 原形質, 細胞間質は al-ph 反応弱く淡染している。しかしところによつては濃く染まっている。泡沫層にては核は濃い黒色を呈するが, 細胞内の al-ph 反応は, それに比較しく淡く染り, また細胞が大きくなるにつれ, 細胞間質の部分は縮小されるが濃く染まっている。予備石灰層に接する部分には, 染色の弱い淡明な層が認め

られる。

b) 妊娠直後, 及び分娩直後からの各実験群における al-ph の分布状態は, 生後 20 日頃までは, 正常群のそれに大体一致している。但し表に示す如く生後日数の進むにつれ, 抗佝僂病性の減退に伴ない, 正常群では, al-ph 反応陰性であつた静止層及び柱状層の核の一部までも反応陽性を示すようになり, 且つまた正常群にても存在する al-ph 反応陽性の部位は正常群のそれよりもさらに強い染色度を呈

してくるようになる。

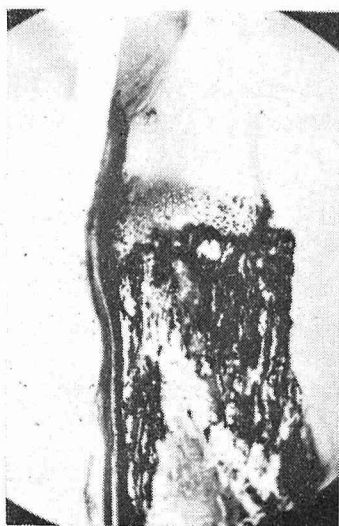
3. 尺骨遠端軟骨の幅と al-ph 分布との関係について：

a) 正常家兎群：この al-ph 分布状態は、大体生後日数により左右されないが、1 で述べた如く骨端軟骨の幅は、生後日数の進むにつれて縮少してくる。全体の幅の変化につれて各層の幅も変化する。しかし各層の内静止層及び柱状層の一部は、al-ph 反応陰性、柱状層の大部分及び膨化層は陽性である。従つて al-ph 反応陰性部も縮少してく

る。生後 10 日目ではまだ al-ph 反応陰性の部の幅が、陽性部に比して広いが生後 20 日以後になると、逆に al-ph 反応陰性部は陽性部に比し漸次縮少してくる。

b) 妊娠直後、及び分娩直後からの各実験群：1 において述べた如く生後日数の進むにつれて、各群における骨軟骨の全体の幅及び各層の幅は、それぞれ特有の変化を示す。しかも抗拘攣病性の消失につれて、al-ph 陽性部は静止層の一部まで漸次拡大する。よつて al-ph 反応陽性部の幅は

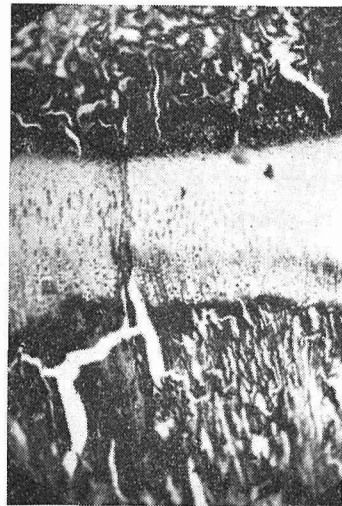
第 2 図 尺骨遠端軟骨におけるアルカリ性フォスファターゼ分布像



a) 生後 10 日
正常家兎



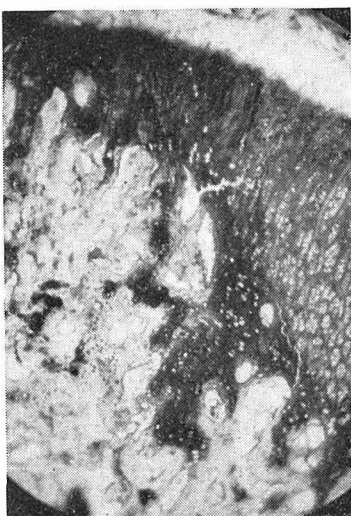
c) 生後 40 日
妊娠直後よりの実験群
V-D₂ 投与



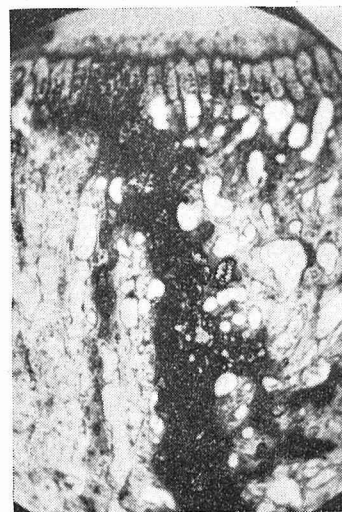
e) 生後 60 日
分娩直後よりの実験群
V-D₂ 投与



b) 生後 30 日
妊娠直後よりの実験群
V-D₂ 非投与



d) 生後 40 日
妊娠直後よりの実験群
V-D₂ 非投与



f) 生後 60 日
分娩直後よりの実験群
V-D₂ 非投与

漸次拡大してくる。

i) 妊娠直後よりの実験群：

家兎母体への V-D₂ 投与群では軟骨幅の拡大による al-ph 反応陽性部の増大は生後 40 日頃より見られ、生後 50 日頃になると静止層の核が一部 al-ph 反応陽性を示すようになり、柱状層の核も陽性を呈する。しかし組織学的に典型的佝僂病像は認められない。

V-D₂ 非投与群では、既に生後 20 日頃より変化が見られ、生後 40 日では、静止層及び柱状層の核は勿論、膨化層の原形質、細胞間質も強く染まり、その膨化層の幅の著明な拡大とともに、al-ph 反応陽性部は非常に増大されている。組織学的にも細胞は、大きさを増し、段々配列が不規則になるのを認め、軟骨基質は融合して、著しく粗大、不規則となり、骨様組織の増殖を見るようになり、典型的な佝僂病像を呈するに至る。骨様組織は核が al-ph 反応陽性、間質はごく弱く染まっている。

ii) 分娩直後からの実験群：

家兎母体への V-D₂ 投与群では al-ph の分布状態は、殆ど正常のそれと大差を見ない。また組織学的に佝僂病変化を認められないが、ただ軟骨端幅の拡大によつて、生後 50 日頃から、al-ph 反応陽性部位が拡大しているが余り顕著ではない。

V-D₂ 非投与群では、軟骨端による変化は、生後日頃より al-ph 陽性部を拡大しはじめるが、生後 40 日頃より静止層の核の一部が淡染し、柱状層の核は陽性となり、全般的に濃染度を増すようになり、生後 50 日頃になると、さらに濃染してき、膨化層の原形質、細胞間質も強く染色度を増してき、膨化層の幅の拡大により、al-ph 陽性部の範囲は非常に拡大され、組織学的にも典型的の佝僂病像を呈する。

総括並びに考按

佝僂病の際、骨端軟骨の幅は、異常に厚くなり、特にその膨化層が異常に拡大してくるのは、一つの組織学的特徴である。

私の実験では、その変化は尺骨遠端軟骨部に最も早期に且、著明に現われてきた。既に生後 10 日において、各実験群とも、V-D₂ 非投与群の軟骨幅が V-D₂ 投与群のそれより幾分広く、特に妊娠直後からの V-D₂ 非投与群は最も広がった。

生後日数の進むとともに正常群では、漸次縮少して行くが他の実験群では、初期には縮少を示すがある時期に至ると、また拡大し始める。その拡大開始の時期は、妊娠直後からの実験では、V-D₂

投与群で生後 40 日、V-D₂ 非投与群で生後 30 日で、大体 10 日前後の差が見られる。分娩直後からの実験群においては、V-D₁ 投与群では生後 50 日、V-D₂ 非投与群で生後 30 日で、大体 20 日前後の差が認められる。

この拡大開始の時期、及び以後の拡大の程度は、第 3 篇において述べる血清学的、レントゲン学的観察に基く、抗佝僂病性の減退の始まる時期、及び以後の抗佝僂病性消失の程度と、大体平行関係が見られる。

そして膨化層の幅の比較では、各群とも V-D₂ 非投与群、特に妊娠直後よりの群が、変化の度著しく、抗佝僂病性の消失とともにその拡大の進行は急激である。

佝僂病における、骨 al-ph の分布については、高松²⁾(1939)、永田¹⁴⁾(1951)等の報告があるが、大体私の所見と一致している。しかし永田の所見と異なる点は、私の典型的佝僂病における所見では、高松と同じく静止層の一部の核も淡染してくるのをみたことである。

私の実験結果から考えて、佝僂病家兎の骨端軟骨における al-ph の増量の変化として、

1) 正常群にても分布する al-ph 反応陽性の部位が、さらにその陽性度を増強してくること。

2) 正常群において al-ph 反応陰性の部位まで漸次反応陽性となつてくること。

3) 骨端軟骨の幅の拡大するにつれて、al-ph 反応陽性部が大体平行して拡してくること。

以上の三つの点を確認することができた。従つて、その結果は第 3 篇に述べる血清学的、レントゲン学的の抗佝僂病性の消失と大体平行して、その al-ph 反応が増強をきたした骨端軟骨部の幅の拡大して行くことが知られ、これと同時に病理組織学的にも、佝僂病の所見を呈するようになつて行くことが観察された。

第 3 篇において詳細に述べるが、各群とも生後 20 日頃までは血清学的、レントゲン学的所見において大差を見なかつた。組織化学的所見においても同様で、これは仔兎は生後 20 日頃まで、主として母乳によつて養われている関係上、Ca、P、及び V-D を母体の代償的補充によつて得ている結果と思われる。

以上私の実験成績につき、軟骨 al-ph の消長と、血清学的、レントゲン学的所見との関連につき述べたが、化骨機転における al-ph の作用に関しては、Robison¹⁾(1933)が生

13) 松崗・三谷：札幌医学雑誌発表予定

14) 永田：日病誌 40, 83 (昭 26)。

長期動物の骨片を種々の磷酸エステル溶液に入れ、その影響を研究して、適当な pH のもとでは、これ等のエステルが al-ph によつて分解されて、関節軟骨に磷酸カルシウムの沈着を起すことを観察したのにはじまる。また Robison¹⁵⁾ (1923) はこの酵素の作用を見るために、in vitro で佝僂病に罹患した幼弱な歯の脛骨または大腿骨を Po_4''' と Ca^{++} との存在する溶液中に浸すと、 $\text{Po}_4''' \times \text{Ca}^{++} = 40$ 以上で骨の石灰沈着が起きた。ところが Po_4''' のかわりに glycerophosphate や Hexosephosphate を入れておくと、イオン積が 40 以下でも石灰沈着が起きるのを観察した。

この観察から、Robison はこのような機構は骨の Ca 塩の沈着に関係があるであろうと考えた。しかしこの説に対し問題になるのは、骨組織が果して、その作用機転に十分な磷酸エステルを保有し得るかどうか、という点である。Robison も指摘しているが、血清は極く微量のエステル型燐 (0.1~0.2) を含有しているに過ぎず、加うるに骨組織 100 ml への血液循環は非常に少ない。従つてこの説が成立つためには、血液による補充以外に、他のエステルの源泉が証明されねばならぬわけである。

ところが Kabat & Furth¹⁶⁾ (1941) や他の人によつて石灰化のはげしく進行している時期には、その骨部分は一つの phosphorylase とともに glycogen を含んでいることが組織化学的に、証明された。この事実から Greenberg¹⁷⁾ (1944) 等は石灰化における glycogen 及び解糖作用における磷酸化反応環の重要性に注目して、次の如く推論した。即ち骨内の phosphorylase は、血液の Po_4''' と骨の glycogen から glucose-1-phosphate を形作る。そしてこの glucose-1-phosphate は軟骨 al-ph の基質となり、加水分解されて Po_4''' を遊離する。この Po_4''' と血液内の Ca^{++} が結合して、 $\text{Ca}_3(\text{Po}_4)_2$ の沈着を起すというのである。

しかしこの推定は、石灰化に解糖作用の過程が重要であることを示しているが、al-ph が存在しても無機磷酸塩の濃度に、意味のある影響を及ぼすに十分な基質を、in vivo にて得られるかどうかという問題に対する完全な証明は未だ与えられていない。

従つてこの al-ph 説に対しては種々の批判が述べられている。

久保・高松¹⁸⁾ (1951) は、骨軟骨肉腫の例をとつて、間葉性の未熟な腫瘍細胞は強く al-ph 反応を示すが、骨の形成を示すところには石灰沈着をきたしても、転移巣等は全く

化骨ないし石灰沈着をきたさぬ。しかもこの部分には一層強い al-ph 反応を示すこと、また生長骨端軟骨部に al-ph の多いのは、骨芽細胞、破骨細胞、骨細胞をはじめ、核状層の一部及び細胞間質に及ぶ間、広く al-ph が存在するため、石灰沈着の起きるより、かなり以前から強い反応を示すことなどから、これ等一連の間葉性細胞は、活動的で不安定の状態にあるとき、強く al-ph 反応を示す性質があつて、化骨期にはそこに石灰が沈着するとみるべきであると述べている。即ち al-ph のあらわれるということ以外に他の条件がなければ、石灰の沈着は起らないといつている。

また Neuman¹⁹⁾ 等(1951) は磷酸エステルが骨塩によつて強く吸着され、かく吸着されたエステルは、佝僂病歯の骨片に、無機物の沈着を抑制することを観察した。そして磷酸エステルが、活性度の高い al-ph のないときは、石灰化に抑制的であるということから次の如く推論している。即ち化骨において重要な役割を演ずるために、高濃度の基質は al-ph にとつて必要とされない。al-ph は磷酸 Ca の沈着を妨げる作用を取去ることによつて、一つの銃における引き金の役割の如く作用しているのかも知れない。しかし Neuman 自身も述べている如く、この現象は in vivo で行われる条件のもとでは、なお多くの検討の余地を残している。

しかし結局現在のところ Robison の al-ph 説は、石灰化における glycogen 及び解糖作用における磷酸化反応と相俟つて、化骨過程を説明するのに、最も妥当なものと考えられる。

かく al-ph は骨の石灰化に非常に重要な要素の一つであるが、これのみでは、化骨機転は説明し得ないのであつて、al-ph の作用は、化骨機転における一つの相、即ち骨塩の飽和のみで、その後の骨蛋白への固着は、骨組織の pH の状態、蛋白基質の無機塩に対する親和性、または他の因子が関係しているものであらうと思われる。

以上化骨機転における骨 al-ph の作用を、さらに佝僂病と関係づけて考察するならば、Demuth²⁰⁾ (1925) は佝僂病の際に、軟骨の al-ph が増量し、ビタミン D の大量投与によつて著しく減少してくることを認めた。児玉・高松²⁾ (1939) も組織化学的に家兎佝僂病の際、骨軟骨の al-ph の増量している事実を認め、その治療により減少して正常値になることを示した。私の実験でも、抗佝僂病性の消失につれて、軟骨の al-ph は正常にはあらわれぬ静止層の一部まで al-ph 反応があらわれ、且つその骨端軟骨 al-ph の

15) Robison: Biochem. J. 17, 286 (1923).

16) Kabat & Furth: Am. J. Path. 17, 303 (1941),

17) Greenberg & Mohamed: Proc. Soc. Exp. Biol. & Med. 57, 203 (1944).

18) 久保・高松: 日病誌, 40, 1 (昭 26).

19) Neuman & Mulargan: J. Biol. Chem. 193, 227 (1951).

20) Demuth: Biochem. Z. 166, 162 (1925).

反応陽性部の幅の拡大と相俟つて全体的に、非常に al-ph は増量することが証明された。

かく佝僂病においては、化骨機転が低下しているにもかかわらず、al-ph は逆に増量するという事実は一見不可解な現象に思われる。

Demuth²⁰⁾ (1935) は佝僂病の骨 al-ph の増量するのは、V-D 欠乏のため、これが利用されぬ結果で V-D 授与により利用され、減少すると述べている。

高松²⁾ 等(1938) はこの事実は、恐らく佝僂病という病的状態における代償的意義を有するものではないかと考えている。しかして田島²¹⁾ (1950) は血液中に al-ph の基質である Na-glycerophosphate 水溶液を注入して、これにより血球及び血清 al-ph の増量するのを認めて、佝僂病等における血清 al-ph の増量するのは、一種の適応現象であろうとして、久保・高松の説に支持を与えている。しかし佝僂病の際に、血液中の基質が増加するか否かは、証明が必要であろう。

これ等の問題を考察する前に、ここで化骨機転と V-D との関係を見てみるに、V-D は小腸における Ca の吸収に役立つ他に、直接に骨に作用するという重要な証明がなされている。

Cohn, Greenberg,²²⁾ (1939), Greenberg²³⁾ (1945) は P^{32} , Sr^{89} , Ca^{45} の isotope を鼠において腹腔内に、または胃内に授与後 72 時間に骨骼に附着するこれ等の割合を見たが、何れの場合も V-D 授与の佝僂病鼠が、授与しない佝僂病鼠より大きかった。この結果から彼等は V-D が、直接に石灰化の過程を刺激し、骨塩の沈着を増大するものと結論した。

また Venar, Todd²⁴⁾ (1939) はビオステロール抽出液が佝僂病鼠の脛骨の“growing Area”の石灰化を in vitro において増大するのを見た。石灰化する量は、溶媒中の Ca-glycerophosphate の量に支配されたが、その増量と同様に、極く少量の V-D 使用は石灰化を促進したという。その他 Nicolaysen²⁵⁾ (1937), Migicovsky 等²⁶⁾ (1949) もそれぞれ V-D の骨への直接作用を実験的に認めている。従つて化骨機転と al-ph の考察には、V-D の作用をも併せて考察する必要がある。

前述の如く、V-D 授与により、佝僂病の際、増量している骨 al-ph が減少すること、及び V-D が直接に骨に作用すること、等から考えて、V-D と骨 al-ph の作用機転の

間には、なん等かの関連性の存在することを示唆している。

最近 Zetterström²⁷⁾ (1952) 等は V-D の al-ph に対する作用について重要な報告をしている。即ち彼等は V-D₂ に化学的操作を施して、水に易溶性の燐酸化合物 (D₂ P) を作り、その al-ph に対する作用を研究した。Phenylphosphate の存在のもとに、(D₂ P) を純化した腎 al-ph に加えると、最初の 20 分間に (D₂ P) 無添加の場合の 2 倍の無機燐酸塩を遊離した。腸 al-ph についても同様であつた。骨 al-ph の場合には、(D₂ P) の作用はさらに強力で最初の 20 分間に 4 倍の無機燐酸塩を遊離した。最高作用に対する (D₂ P) の濃度は非常に低く 10^{-5} M 程度で、最強作用を pH 9.7 で示したという。これは al-ph の至適 pH に近い。Zetterström 等の研究成果から考えて、佝僂病における V-D の作用は、骨 al-ph と相俟つて、酵素的にその化骨機転に関与しているものと思われる。

以上化骨機転に関する諸説を述べ、それに参照する al-ph 及び V-D の作用機序、特に佝僂病時における諸相を検討した。

これを要するに、佝僂病は骨発育の最も旺盛なる時期に発病するから、骨の成長帯たる骨端軟骨部の細胞増殖層は成長刺激により、細胞分裂が旺盛となり骨様組織の新生も極めて激甚となるにもかかわらず、骨塩の沈着が甚だ不全であるか、全く起らない。この不全を解消せんとして代償的に al-ph の増量が招来される。しかるに al-ph は V-D によつて賦活され、その能力を発揮するとすれば、V-D 欠乏を主因とする佝僂病においては al-ph の増量によつても、化骨機転の進展は全く起り得ない。この際 V-D 授与によつて始めて al-ph はその機能を發揮して骨塩の沈着を促進し、その任務を果し消失して行くと考えたい。私の実験においても抗佝僂病性の減退、言葉をかえれば V-D の欠乏するにしたがつて骨端軟骨部が拡大、膨化をきたし同時に al-ph の増量して行くことが認められた。

結 論

妊娠及び授乳期の家兎母体に、V-D₂ 大量衝撃療

21) 田島：日病誌，39，116(昭 25)，

22) Cohn & Greenberg：J. Biol. Chem. 130，625 (1939)。

23) Greenberg：J. Biol. Chem. 157，99(1945)。

24) Venar & Todd：J. Lab. Clin. Med. 22，221 (1936)。

25) Nicolaysen：Biochem. J. 31，107(1937)。

26) Migicovsky & Emslie：Arch. Biochem. 29，325 (1949)。

27) Zetterström：Nut. Rev. 10 (1952)。

法を実施し、その娩出仔兎群と、非投与群のそれとを、佝僂病食飼、暗室において飼育した際の、骨 al-ph の消長を生後日数を追うて観察した。あわせて正常家兎群についても観察し、次の如き成績を得た。

1. 正常家兎群：

a) 成長過程による al-ph の分布上の差異は、認められない。

b) 骨端軟骨の幅は、生後日数の進むにつれて、漸次縮少してき、その al-ph 反応陽性部は、それと大体平行して、その厚さを縮少した。

2. 妊娠直後、分娩直後よりの実験群：

a) 生後 20 日頃までは各群とも、正常群と比較して、大差は認められないが、生後 20 日以後になつて、それぞれの抗佝僂病性の程度に従い、異なつた態度を示した。

b) 骨端軟骨の幅は、初期には縮少するが、抗佝僂病性の減退し始める時期に至ると、また拡大

してくる。軟骨端 al-ph 陽性部の幅も大体それと平行して増減する。

c) 佝僂病性変化の進行につれて、正常群にても分布する al-ph の染色度が実験群においては漸次増強し、また正常群で al-ph 反応陰性部を示す静止層、及び柱状層の核の一部にも、実験群においては反応陽性を示してきた。

d) 佝僂病における血清学的、レントゲン学的所見と、軟骨 al-ph の組織化学的所見との間にはほぼ一定の関連性があり、軟骨 al-ph の増大の度は、大体佝僂病性変化の進行の度と平行するようである。特にその軟骨端における al-ph 反応陽性部の幅において、その分布状態より明瞭に観察し得た。

拙筆に臨み病理組織学的方面における病理学教室塚田助教授の御教示に対し深く感謝します。

(昭和 29. 11. 26 受付)

Summary

Part I

Experimental animals (infant rabbits) were divided into 2 groups. In the first group, mothers of the infant rabbits were treated with large dosis of vitamin D₂ (3 mg per kg body weight) during their pregnancy (Group A) and in the second group, the mother rabbits were treated immediately after delivery (Group B).

The Control group showed positive rachitogenic conditions without vitamin D₂ application.

Alkaline phosphatase activity of the distal end of ulna was examined histochemically in the above 3 group, under rachitogenic diet.

The results obtained were as follows.

1) No difference was observed among the 3 groups until 20 days after birth.

2) In comparing Group A with its control, the rachitic increase of positive alkaline phosphatase reaction area due to widened epiphyseal cartilage was observed later.

3) In Group B, the above mentioned rachitic changes developed later than those in control.

(Received Nov. 26, 1954)